人二倍体细胞KMB$_{-17}$株和MRC$_{-5}$株生物学性质比较

戴永祥 曾政德 胡晓玉 王明秀 董德祥
(中国医学科学院医学生物学研究所 昆明)

关键词 胚胎 成纤维细胞 人 二倍体 染色体

用人二倍体细胞代替原代猴肾细胞生产脊髓灰质炎疫苗可避免猴病毒污染。为了向脊髓灰质炎活疫苗生产提供安全、可靠的细胞基质，我所于1972年建立了一株人二倍体成纤维细胞KMB$_{-17}$株（昆明医学生物学研究所，1974）。该细胞株现已在液氮中冻存十年。本文报告检查KMB$_{-17}$株生物学性状有无变化的结果，并与国际上广泛应用的MRC$_{-5}$人二倍体细胞株作比较。

材料和方法

细胞来源 本实验所用的KMB$_{-17}$细胞株为我所建立冻存的6代种子安瓿，MRC$_{-5}$细胞株为英国J. P. Jacobs提供的10代种子细胞，在我实验室冻存为12代的种子安瓿。

细胞复苏及培养 用37°C水浴融化安瓿，打开安瓿，将细胞悬液移入生长液中，按每毫升20—50万接种于小罗氏瓶，放37°C静止培养。细胞生长液为本实验室的I号溶液加10%小牛血清，1%的青链霉素，1—1.2%的$NaHCO_3$，pH7.4，测定生命期。

检查项目

（一）潜在因子检查

1. 无菌检查 将KMB$_{-17}$株及MRC$_{-5}$株分别取细胞培养液上清，接种于胰酪、马丁、支原体培基，37°C孵育（马丁22°C），7天判定是否被细菌、霉菌及支原体污染。

2. 病毒因子检查分体内、体外两部份。体内部分用细胞悬液，分别接种家兔、豚鼠、乳鼠、成年小白鼠及鸡胚。其浓度每种动物为1×10^7细胞。接种方法及结果判定

注：本文所用MRC$_{-5}$细胞株系由本所郭仁大夫从英国带回，特致谢意。

本文1984年1月30日收到，1984年8月15日收到修改稿。

见本所以前报告（郭仁等，1981）。

体外部份包括直接观察细胞，被检细胞培养液上清接种人胚肾原代细胞、幼兔肾原代细胞、Hela细胞系及另一株人二倍体细胞，即用KMB_{-17}株及MRC_{-5}株细胞互相接种进行交叉检查。以上各种细胞培养成单层，每种细胞接种8瓶，取被检细胞KMB_{-17}株及MRC_{-5}株的细胞培养液上清混于不含血清的维持液中，使占维持液25%接种于上述四种弃去旧培养液的细胞瓶中，于34°C孵育观察14天，用血吸方法判定结果。

（二）致癌性检查　本文采用抗淋巴血清(ATS)反复处理的小白鼠。用细胞悬液按每只小鼠1×10^7细胞接种。同时以Hela细胞作对照，接种浓度为每只小鼠1×10^6。观察2周后处死做病理检查。

（三）胞核学检查　用不同代次的两株细胞的细胞分裂中期，用常规空气干燥法制备染色体标本。每个标本低倍镜下粗读300个中期细胞，油镜精确读数100个以上。

（四）HBsAg检查　用无菌检查相应细胞代次的上清液，以被动血凝抑制方法进行。

（五）电镜检查　用KMB_{-17}株及MRC_{-5}株的细胞单层制片，进行细胞细微结构、胞质内异质颗粒以及支原体检查。

（六）病毒敏感试验　用脊髓灰质炎三个型病毒，接种于KMB_{-17}株及MRC_{-5}株细胞单层上，接种的病毒浓度为每毫升维持液含$10^{5.0}$PFU。完全病变时收获病毒，用空斑法测定病毒滴度。

结　果

细胞生命期测定　KMB_{-17}细胞株用第6代种子安瓿复甦，存活率为80%。当接种浓度为每毫升23万时，4小时后即均匀贴瓶，3—4天形成致密单层。分种比率为1：2—1：4。在47代前细胞贴瓶、生长繁殖持续保持旺盛，表现为贴瓶数多、均匀，折光性强，形成单层时间均在4天左右。48代后生长繁殖情况较为迟缓，贴瓶数较前减少，折光性减弱，形成单层时间延长为5—10天。这种表现在55代后更为明显：细胞形态拉长，界限不清，立体感弱。62代细胞已近衰退，15天还未形成单层，形态呈网状，无法传代，生命终止。此过程与建株时生长情况一致。

MRC_{-5}细胞株用12代种子安瓿复甦，存活率为71%。接种浓度为每毫升15万。该株细胞在本实验室整个体外培养生命期为47代。在33代前细胞生长繁殖、形成单层时间（一般4天左右）及细胞形态都较均衡，无明显差异，以后进入滞缓期，表现为细胞形态拉长，形成单层时间延长至6天左右，但仍可一周内传代一次。42代后形态较差，立体感减弱，界限不清。到47代时细胞难于维持，一旦成片，即行脱落、拉网，16天还未形成单层，生命终止。此与Jacobs（1970）的报告相符

外源因子检查结果　对KMB_{-17}株复甦后及18、28、38、50代五个代次，MRC_{-5}株12、22、30、38代四个代次的培养物进行了细菌、霉菌、支原体检查，结果均为阴性。

对两株上述代次细胞进行的HBsAg检查，在几种组织培养物上病毒因子检查（表

1），用HE染色法对两株细胞进行的包涵体检查，结果均为阴性。

用KMB_{-17}株18、50代，MRC_{-5}株22、38代的细胞直接接种动物，结果均为阴性（表1）。

用ATS反复处理的小白鼠接种KMB_{-17}18、50代，MRC_{-5}22、38代的细胞，到期解剖均未发现肿瘤结节。同时接种低于上述细胞10倍量的Hela细胞对照组，到期尸检时均查得肿瘤结节，经病理检查均为恶性肿瘤细胞（表2）。

Table 1　Examination results of extraneous virusagents in two cell strains

株名	代数	体外部分*					体内部分**				
		直接观察瓶	人胚肾原代细胞瓶	幼兔肾原代细胞瓶	Hela瓶	交叉检查瓶	家兔只	乳鼠只	成鼠只	鸡胚只(9日龄)	豚鼠只
KMB_{-17}	18	8	8	8	8	8	5	10	10	10	5
	28	8	8	8	8	8					
	38	8	8	8	8	8					
	50	8	8	8	8	8	5	10	10	10	5
MRC-5	22	8	8	8	8	8	5	10	10	10	5
	30	8	8	8	8	8					
	38	8	8	8	8	8	5	10	10	10	5
结果判定		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

*为体外接种部分　**为体内接种部分，每种动物接种1×10^7被检细胞

*In vitro　**In vivo Inculation examinated cell of using at least 1×10^7 for each animal

Table 2　Examination results of careinostatic in two cell strains

株名	代数	成鼠（只）	接种浓度(万/ml)	送检只数	结果判定
KMB_{-17}	18	6	5×10^7	6	-
	50	6	5×10^7	6	-
MRC_{-5}	22	6	5×10^7	6	-
	38	6	5×10^7	6	-
Hela		6	5×10^6	6	+

用KMB_{-17}株18、30、50代，MRC_{-5}株22、39代细胞进行电镜检查，在5个样本中均未见到细胞内有任何异质颗粒及支原体，细胞细微结构均无变化。

细胞遗传学分析　用KMB_{-17}株18、28、38、50代，MRC_{-5}株22、30、38代细胞做染色体检查，两株细胞所检到的染色体异常机率（表3），和国际上(Jacobs, 1976)推荐用于病毒疫苗生产的细胞株染色体分析标准相比（表5），两株细胞出现的异常机率均在可接受的国际标准上限以内（表5）。同时发现MRC_{-5}株的多倍体机率较KMB_{-17}株

高，且随代数增加而上升，但都在标准以内（Moorhead，1974；Jacobs，1976）。

病毒敏感试验 将脊髓灰质炎三个型病毒按每毫升维持液 $10^{5.0}$PFU 接种于 KMB_{-17}株28、36代，MRC_{-5}株26、36代细胞，所得结果见表4。从结果看出两株细胞间病毒敏感性无明显差异。与原毒种滴度相比亦无明显改变。但 MRC_{-5} 株细胞出现病变和收获病毒时间较KMB_{-17}为早，前者最迟66—76小时，后者则有的在 100 小时以上。

讨 论

用人二倍体细胞生产脊髓灰质炎病毒疫苗是既经济又安全的途径。对它尚存在的问题如：病毒繁殖滴度较低，不加大病毒接种量容易使疫苗毒力回升等，（国外医学，1983）目前尚在深入研究。从本文试验结果来看，两株细胞在生长繁殖等生物学性状及细胞异

Table 3 Examination results of chromosome in two cell strains (%)

株名	代数	断裂或间隙	超二倍体	亚二倍体	多倍体*	结构异常	2n=46
KMB_{-17}	18	2	2	9	1.6	0	85.4
	28	1	1	4	1.3	3	89.7
	38	1	2	12	3	0	82
	50	2	2	7	1.5	1	86.5
MRC_{-5}	22	2	3	6	3.6	1	84.4
	30	2	2	10	2	0	84
	38	3	4	5	6	0	82

* 两株细胞多倍体机率无明显差异（$p>0.05$）

* NO marked difference in polyploid between two cell strains ($p>0.05$)

Table 4 Sensitivity to polio viruses in two cell strains (Log/ML PFU)

株名	代数	病毒型别		
		I	II	III
KMB_{-17}	18	6.45(7.20)*	6.85(6.73)*	7.15(7.23)*
	36	7.05	6.85	6.70
MRC_{-5}	26		6.95	7.0
	36	7.05	6.95	7.05

* 括号内数字为原毒种滴度

种移植性等方面和以前发表的资料一致（郭仁等，1981；Jacobs，1970；1976）。在遗传学检查中MRC_{-5}株的多倍体机率稍高于KMB_{-17}株，但两者无显著差异（$p>0.05$），仍在国际标准范围之内（表5）。两株细胞对脊髓灰质炎三个型病毒敏感性相同，MRC_{-5}株细胞在病变出现和收获病毒时间上较KMB_{-17}为早，但从病毒滴度上看无明显差异。

Table 5 Comparison among examination results of chromosome in two cell strains and international standardization and orginal strains

名　称	断裂或间隙	超二倍体	亚二倍体	多倍体	结构异常
可接受之上限	8/100	2/100	18/100	12/300	3/100
KMB-17株原系15代结果	3/100	0/100	9/100	5.3/300	0/100
本次试验18代结果	1/100	2/100	9/100	6.4/300	0/100
原系50代结果	0/100	2/100	11/100	6/300	2/100
本次试验50代结果	2/100	2/100	7/100	4.5/300	1/100
MRC-5株原系23代结果	3/100	0/100	14/100	9/300	1/100
本次试验22代结果	2/100	3/100	6/100	10.8/300	1/100
原系38代结果	2/100	0/100	14/100	12/300	0/100
本次试验38代结果	3/100	4/100	5/100	18/300	0/100

结果表明，KMB-17人胚肺成纤维细胞株经十年冻存后其生物学性状无明显变化，与MRC-5参考株一样均可作为病毒疫苗的基质细胞使用。

参 考 文 献

昆明医学生物研究所防治室代用品组　1974　人二倍体细胞株KMB-17的建立及其生物学性质的初步观察　遗传学报（1）:147—155

郭红仁等　1981　人二倍体细胞株KMB-17的特性　中国医学科学院学报　3（4）:226—229

International Association of Microbiological societies. Cell Culture Committee. Minutes of the Eighth Meeting, Chatham Bars, Oct. 1971 *Geneva Biostandards* 71.

Jacobs J. P *et al* 1970 Choracteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* 227:168—170

Jacobs, J. P. 1976 Updated results on the karyology of the WI-38, MRC-5 and MRC-9 cell strains. Dev in Biol Standard 37:155—156

Lerkins, F 1983 生物制品的质量检查，国外医学，生物制品分册　4:168—170

Moorhead P. S *et al*. 1974 Standards of Karyology for human diploid cell. *J Biol Standard* 2:95—101

WHO Expert Committee on Biological Standardization (24th Report), *WHO Tech.Rep Ser*, No 486.1972

COMPARISON ON BIOLOGICAI PROPERTIES BETWEEN KMB_{-17} AND MRC_{-5} HUMAN DIPLOID CELL STRAINS

Dai Yongxiang Guan Zhende Hu Xiaoyu Wang Mingxiou Dong Dexiang

(Institute of Medical Biological Kunming)

Human diploid cell has been used in producing virus vaccines. It can prevent serious contaminations of simian viruses and other pathagenic factors. KMB_{-17} strain has been kept in −196 °C for more than ten years, and it has been exfensively used in producing virus vaccines and researching in medical sciance in our country.

This paper reports that the results of the tests of the chromosome, in vitro cell life and sensitivity to ploviruses in KMB_{-17} human diploid cell strain was examated.

The results suggested that the KMB_{-17} human diploid cell strain remains stable on biological properties after freezing more than ten years and without any marked changes. KMB_{-17} and MRC_{-5} human diploid cell strains as the cell substrates are effectually used to produce virus vaccines.

Key words Fetal Fibroblast Human Diploid Chromosome